

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOESTRUCTURAS ACTIVAS A BASE DE ALCOHOL POLIVINILICO Y EMULSIONES OBTENIDAS POR ELECTROHILADO

J. Lamarra¹, S. Rivero¹, A. Pinotti^{1,2}

¹-Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA-UNLP-CONICET-CIC), Facultad de Ciencias Exactas, UNLP. 2-Facultad de Ingeniería, UNLP.

jlamarra@quimica.unlp.edu.ar

INTRODUCCIÓN

Dentro del campo de la nanotecnología el empleo de procesos electrodinámicos constituye uno de los métodos de vanguardia permitiendo la formación de nanoestructuras a partir de diferentes polímeros con dimensiones en el rango de 5 a 500 nm. Recientemente se ha destacado la utilidad de las nanofibras para las aplicaciones biomédicas (Sapru *et al.* 2018), especialmente como matrices protectoras de pieles o dispositivos de liberación controlada.

Uno de los polímeros más utilizados para la obtención de nanofibras es el alcohol polivinílico (PVA). El PVA es un polímero sintético, biodegradable, semicristalino, hidrofílico con excelentes propiedades mecánicas, las cuales se deben a la presencia de grupos -OH que permiten establecer interacciones de tipo puente de hidrógeno (Villarruel *et al.*, 2015).

Es escasa la bibliografía referente al ensamblado de polímeros y emulsiones con aceite esencial encapsulado para formar nanofibras.

Los objetivos del trabajo fueron obtener nanofibras mediante la técnica de electrohilado a partir de soluciones con diferente concentración de PVA y sus mezclas con emulsiones entrecruzadas con citrato de sodio y funcionalizadas con aceite esencial de cabreuva. Asimismo, se propuso estudiar la morfología de las matrices obtenidas por microscopía electrónica de barrido (SEM) y confocal laser de barrido (CLSM) y analizar sus propiedades microestructurales por medio de ATR-FTIR, difracción de rayos X (DRX) en relación a las películas obtenidas por la metodología de moldeo y deshidratación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Formulación de las soluciones

Se preparó una solución de PVA al 14% (p/v) por solubilización en agua a una temperatura de 90°C. La nomenclatura utilizada para esta solución fue PVA₁₄.

Por otra parte, se prepararon soluciones de PVA al 16% (p/v), para la formulación de las soluciones compuestas con emulsiones entrecruzadas (EE) funcionalizadas con aceite esencial de cabreuva. Para ello, se homogeneizaron las fases en una relación 4:1 (PVA:EE).

Propiedades reológicas de las soluciones

Se utilizó un reómetro Haake RheoStress600 (Alemania) con un sistema sensor plato-plato de superficies rugosas, con una distancia entre platos de 1mm. A partir de los ensayos rotacionales se obtuvieron las curvas de flujo de esfuerzo de corte en función de la velocidad de deformación.

Formación de fibras por electrohilado

Para la técnica de electrohilado, se usó una fuente de alta tensión operada a 24 kV (Argentina), una bomba de infusión a jeringa PC11UB APEMA (Argentina) que permitió suministrar un flujo de 0,4 ml/h de solución polimérica y un sistema colector de acero inoxidable. Se obtuvieron nanoestructuras denominadas PVA_E y PVA+EE.

Por otra parte, se prepararon películas de PVA al 14% (p/v) por el método de moldeo y secado a 37°C hasta peso constante. Esta película se denominó PVA_{MS}.

Morfología de las nanoestructuras

La evaluación de la morfología de las fibras obtenidas se realizó a través de un microscopio electrónico de barrido FEI modelo Quanta 200 (The Netherlands). Las muestras se fracturaron por inmersión en nitrógeno líquido, y se montaron sobre tacos de bronce a través de una cinta doble faz de carbón. El diámetro de las fibras fue calculado con el programa Fiji (Image J)

Propiedades relacionadas con la afinidad por el agua

La permeabilidad al vapor de agua se determinó según una modificación del método ASTM E96 (Rivero *et al.*, 2009), a través del uso de una celda de permeabilidad de construcción casera la cual fue mantenida a 20°C. Una vez alcanzado el estado estacionario, las celdas fueron pesadas a lo largo de 9 h.

El contenido de humedad de las películas se determinó mediante secado en estufa a 105°C hasta peso constante; los resultados se expresaron en gramos de agua por 100 g de muestra.

Difracción de rayos X

Las matrices formadas fueron analizadas por difracción de rayos X usando un equipo Philips PW 3710, X'Pert Pro P Analytical ModelPW3040/60 (Almelo, Países Bajos). Se operó con radiación CuK (1.542 Å) a temperatura ambiente a 40 kV y 30 mA. La intensidad relativa fue registrada en el rango de (2θ) 3-60°.

ATR-FTIR

El estudio de la contribución de cada componente a las interacciones se llevó a cabo mediante determinaciones de ATR-FTIR. Los espectros fueron registrados con un equipo Nicolet iS10 Thermo Scientific (Madison, USA) por la acumulación de 32 barridos a 4 cm⁻¹ de resolución en el rango comprendido entre 400-4000 cm⁻¹. Las muestras fueron colocadas sobre un cristal de diamante de ATR (Smart iTX accessory).

Microscopio confocal láser de barrido (CLSM)

Se utilizó un microscopio confocal láser Olympus FV300 con un aumento de 20X y un láser DAPI para la identificación del aceite esencial en las nanoestructuras desarrolladas. Para el análisis de los resultados se utilizó el programa Image J Fiji el cual permitió realizar una estimación de la intensidad de fluorescencia en cada sección de la muestra considerada.

RESULTADOS

Comportamiento reológico de las soluciones

La concentración y viscosidad de la solución polimérica es uno de los factores que determinan la morfología y el tamaño de las fibras poliméricas electrohiladas. Las soluciones compuestas a base de PVA:EE sometidas al proceso de electrohilado exhibieron un comportamiento no-newtoniano a diferencia del comportamiento newtoniano de las emulsiones entrecruzadas.

A partir de los ensayos rotacionales se obtuvieron las curvas de flujo de esfuerzo de corte en función de la velocidad de deformación. El comportamiento reológico se ajustó matemáticamente utilizando el modelo de Ostwald de Waele, $\tau = k \dot{\gamma}^{n_v}$

donde: k_v es el índice de consistencia y n_v el índice de comportamiento de flujo. La viscosidad aparente fue determinada a 500 s⁻¹. Los parámetros de ajuste del modelo se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Parámetros de ajuste del modelo de Ostwald de Waele y viscosidad a 500 s⁻¹.

Soluciones	K_v	n_v	η (Pa.s a 500 s ⁻¹)
PVA 14 %	24,27±0,08 ^a	0,649±0,002 ^a	2,69±0,03 ^a
PVA+EE	5,1±0,1 ^b	0,820±0,003 ^b	1,68±0,07 ^b

Los valores informados corresponden a la rampa ascendente de la curva de comportamiento de flujo. Letras diferentes dentro de una misma columna indican diferencias significativas entre las muestras (p<0,05).

Se puede observar en la Tabla 1 una disminución en la viscosidad a 500 s^{-1} , de lo que se puede inferir que la disminución en la concentración de PVA por agregado de la emulsión entrecruzada llevó a una menor capacidad para formar fibras continuas. Pangon *et al.* (2016) formaron fibras por electrohilado utilizando mezclas de Q con distintas concentraciones de PVA registrando un aumento en la viscosidad con el aumento de concentración del PVA, debido a la interacción polímero-solvente en presencia del quitosano. En ambos casos puede observarse que el valor del índice de consistencia fue menor que 1, reflejando un comportamiento pseudoplástico (Pal *et al.* 2017). La incorporación de la emulsión a la solución polimérica llevó a valores de n_v cercanos a 1. Este resultado es similar al observado por Pal *et al.* (2017) trabajando con emulsiones de policaprolactona dispersas en una fase continua de PVA.

Morfología de las nanoestructuras

Las películas obtenidas por el método del moldeo y deshidratación fueron transparentes (PVA_{MS}) mientras que las películas de PVA (PVA_{E}) formadas por electrohilado exhibieron una coloración blanca. La formación de la malla de fibras genera un proceso de dispersión de luz que produce esa coloración. En la Figura 3 a y b se muestran las micrografías de las fibras de PVA_{E} y $\text{PVA}+\text{EE}$ obtenidas por la técnica de electrohilado, respectivamente.

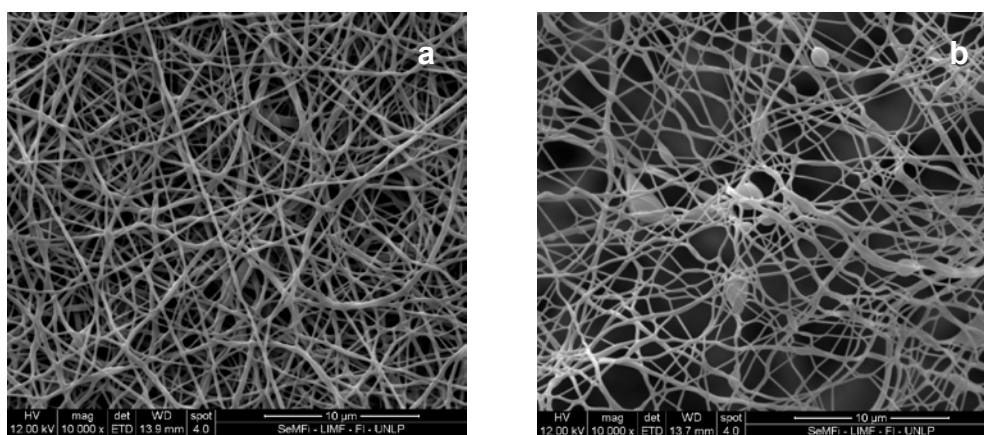


Figura 3. Micrografías SEM de fibras a base de PVA_{E} y PVA incluyendo una emulsión entrecruzada funcionalizada con aceite esencial de cabreuva ($\text{PVA}+\text{EE}$).

Mediante observación por SEM, la muestra PVA_{E} (Figura 3a) exhibió una estructura uniforme mientras que la inclusión de la emulsión entrecruzada llevó a la formación de cuentas en la estructura la matriz (Figura 3b). Este comportamiento puede explicarse considerando la relación entre la concentración de polímero y la viscosidad de la solución polimérica (Phacahmud *et al.* 2011).

El ensamblado del polímero con la emulsión generó un sistema más fluido, con la consecuente formación de cuentas que interrumpen el entramado de las fibras de PVA. Resultados similares fueron encontrados por Puttamayutanon *et al.* (2012), observando que el agregado de miel en concentraciones crecientes aumentó en el número de cuentas presentes en la microestructura del PVA. Otro aspecto a tener en cuenta es que las emulsiones poseen quitosano, lo cual genera una modificación en el proceso de electrohilado.

Asimismo, las micrografías obtenidas por CLSM permitieron observar una distribución uniforme del aceite de cabreuva debido a su fluorescencia intrínseca (Figura 4).

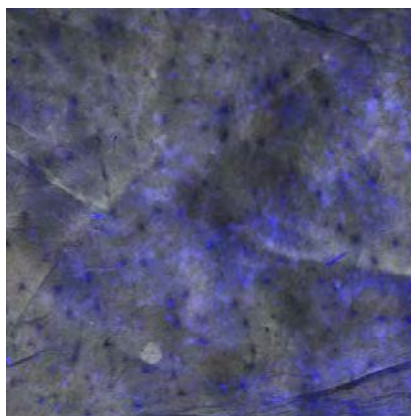


Figura 4. Micrografía CLSM de fibras de PVA+EE obtenidas por electrohilado mostrando la distribución del aceite esencial de cabreuva.

La Tabla 2 muestra los valores de WVP de las películas obtenidas por electrohilado. Se observó un aumento de la permeabilidad en relación a las películas de PVA obtenidas por moldeo demostrando que la formación de fibras generó una matriz más porosa con el consecuente aumento en la transferencia de materia. Con respecto a la humedad no se observan modificaciones con la formación de fibras.

Propiedades asociadas al agua

Tabla 2. Contenido de humedad (%) y permeabilidad al vapor de agua de las matrices obtenidas por moldeo y secado así como las nanoestructuradas procesadas por electrohilado

Muestra	% de Humedad	WVP(g /m.s.Pa)x10 ¹⁰
PVA _{MS}	9,9±0,6 ^a	-
PVA _E	13±5 ^a	6,42 ^a
PVA+EE	10±1 ^a	3,23 ^b

Letras diferentes dentro de una misma columna indican diferencias significativas entre las muestras (p<0,05).

DRX

En la Figura 5 se muestran los difractogramas de rayos X de las muestras PVA_{MS} obtenidas por moldeo y secado en estufa y las ensambladas por el método de electrohilado PVA_E. Asimismo, se puede observar el patrón DRX correspondiente a las nanoestructuras PVA+EE

El PVA presentó un pico agudo de difracción ubicado a 19°, cuya intensidad disminuyó como consecuencia del procesamiento del polímero por electrohilado acompañado por la disminución en la cristalinidad del polímero. Basha *et al.* (2017) aseveraron que la disminución de la cristalinidad del polímero representa una ventaja para aplicaciones biomédicas, ya que favorece la proliferación celular. Pangon *et al.* (2016) informaron resultados similares al trabajar con mezclas de quitosano y PVA entrecruzadas con distintos ácidos. Estos autores también informaron que la pérdida de cristalinidad se asocia al arreglo estructural debido al cambio en la orientación de las cadenas durante el proceso de electrohilado. Krstic *et al.* (2018) señalaron que durante el proceso de electrohilado las moléculas se orientan en dirección de las fibras dándole menos tiempo para que se puedan alinear entre sí, generando una densidad de empaque diferente. Según Ghosal *et al.* (2018) la metodología de moldeo y deshidratación genera una estructura con mayor ordenamiento y cristalinidad debido a la evaporación más lenta del solvente.

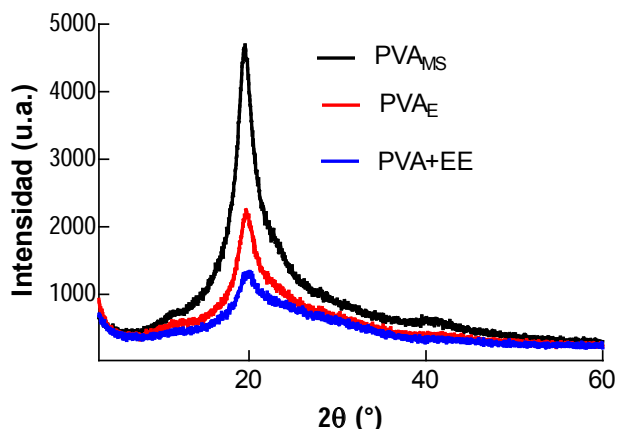


Figura 5. Difractogramas de rayos X de las distintas muestras estudiadas.

ATR-FTIR

El análisis ATR-FTIR permitió estudiar los cambios experimentados por el PVA luego del proceso electrohilado en los modos vibracionales.

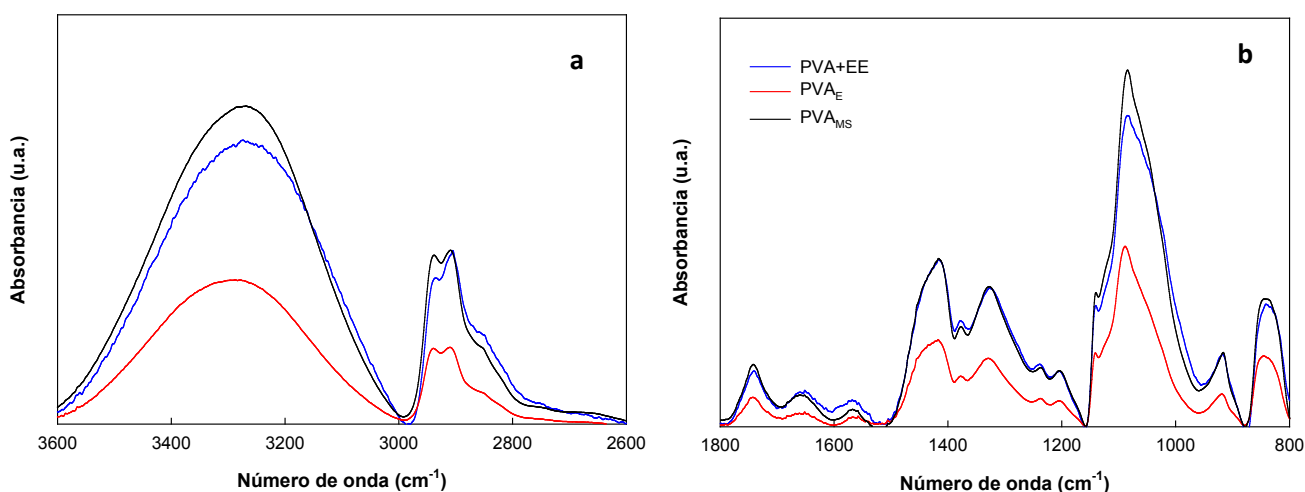


Figura 6. Espectros de absorción ATR-FTIR de las muestras PVA_{MS}, PVA_E, PVA_E y PVA+EE de las regiones comprendidas entre: a) 3600-2600 cm⁻¹ y b) 1800-800 cm⁻¹.

La Figura 6a y b muestra el espectro de ATR-FTIR de las matrices PVA_{MS}, PVA_E y PVA+EE en la región del modo vibracional de los grupos -OH del polímero. La región comprendida entre 1150 y 960 cm⁻¹ se asigna a la banda de absorción debida a la cristalinidad del polímero (Villaruel *et al.* 2015).

El ensamblado de la emulsión entrecruzada funcionalizada en la solución de PVA generó modificaciones en las señales espectrales en la región comprendida entre 3600 y 2600 cm⁻¹ y 1800-800 cm⁻¹. La modificación en la banda localizada a 1100 cm⁻¹ se correlacionaría con un cambio en la cristalinidad debido a la técnica de obtención de la matriz. Estos resultados se confirmaron por DRX, dando indicios de que la presencia de la emulsión funcionalizada con aceite esencial produce cambios no solo morfológicos, sino estructurales en la matriz de alcohol polivinílico.

CONCLUSIONES

Del análisis del comportamiento reológico de las soluciones a base de PVA se pudo inferir la influencia de la incorporación de la emulsión entrecruzada a la solución de PVA para la formulación de sistemas compuestos sobre la viscosidad y la morfología de las nanoestructuras obtenidas. En comparación con la metodología de moldeo, los procesos electrodinámicos generaron estructuras con propiedades diferenciales atribuidas a los cambios en la cristalinidad del polímero. Las nanoestructuras desarrolladas se presentan como materiales con potenciales aplicaciones en el campo biomédico.

REFERENCIAS

- Basha, R. Y., Sampath Kumar, T. S., y Doble, M. (2017). Electrospun nanofibers of curdlan (β -1, 3 glucan) blend as a potential skin scaffold material. *Macromolecular Materials and Engineering*, 302(4), 1600417.
- Ghosal, K., Chandra, A., Praveen, G., Snigdha, S., Roy, S., Agatemor, C., Thomas S., y Provaznik, I. (2018). Electrospinning over solvent casting: Tuning of mechanical properties of membranes. *Scientific Reports*, 8(1), 5058.
- Krstić, M., Radojević, M., Stojanović, D., Radojević, V., Uskoković, P., y Ibrić, S. (2017). Formulation and characterization of nanofibers and films with carvedilol prepared by electrospinning and solution casting method. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 101, 160-166.
- Pal, J., Wu, D., Hakkarainen, M., y Srivastava, R. (2017). The viscoelastic interaction between dispersed and continuous phase of PCL/HA-PVA oil-in-water emulsion uncovers the theoretical and experimental basis for fiber formation during emulsion electrospinning. *European Polymer Journal*, 96, 44-54.
- Pangon, A., Saesoo, S., Saengkrit, N., Ruktanonchai, U., y Intasanta, V. (2016). Multicarboxylic acids as environment-friendly solvents and in situ crosslinkers for chitosan/PVA nanofibers with tunable physicochemical properties and biocompatibility. *Carbohydrate Polymers*, 138, 156-165.
- Phachamud, T., y Phiriyawirut, M. (2011). Physical properties of polyvinyl alcohol electrospun fiber mat. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 2(2), 675-684.
- Puttamayutanon, P., Sutjarittangtham, K., Eitssayeam, S., y Chantawannakul, P. (2012). Nanofiber production using polyvinylalcohol (PVA) and Thai honey and its properties. *Advanced Materials Research*, 506, 541-544).
- Sapru, S., Das, S., Mandal, M., Ghosh, A.K., y Kundu, S.C. (2018). Prospects of nonmulberry silk protein sericin-based nanofibrous matrices for wound healing—In vitro and in vivo investigations. *Acta biomaterialia*, 78, 137-150.
- Villarruel, S., Giannuzzi, L., Rivero, S., y Pinotti, A. (2015). Changes induced by UV radiation in the presence of sodium benzoate in films formulated with polyvinyl alcohol and carboxymethyl cellulose. *Material Science and Engineering C*, 56, 545-554.